

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Gisele Vaz Aguirre Samoel

**DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-*Trypanosoma* spp. EM BOVINOS
DO RIO GRANDE DO SUL**

Santa Maria, RS

2023

Gisele Vaz Aguirre Samoel

DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-*Trypanosoma* spp. EM BOVINOS DO RIO GRANDE DO SUL

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Sanidade e Reprodução Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Medicina Veterinária**.

Orientadora: Fernanda Silveira Flores Vogel

Santa Maria, RS

2023

Samoel, Gisele Vaz Aguirre
DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-Trypanosoma spp. EM
BOVINOS DO RIO GRANDE DO SUL / Gisele Vaz Aguirre
Samoel.- 2023.
40 p.; 30 cm

Orientador: Fernanda Silveira Flores Vogel
Coorientador: Juliana Felipetto Cargnelutti
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós
Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2023

1. Parasitologia veterinária 2. Tripanossomose bovina
I. Silveira Flores Vogel, Fernanda II. Felipetto
Cargnelutti, Juliana III. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UPSEM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, GISELE VAZ AGUIRRE SAMOEL, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Gisele Vaz Aguirre Samoel

DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-*Trypanosoma* spp. EM BOVINOS DO RIO GRANDE DO SUL

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Sanidade e Reprodução Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Medicina Veterinária**.

Aprovado em 18 de setembro de 2023

Fernanda Silveira Flores Vogel, Dr^a (UFSM)
(Presidente/ Orientadora)

Luis Antônio Sangioni, Dr (UFSM)
(Avaliador)

Patrícia Braunig, Dr^a (UFSM)
(Avaliadora)

Santa Maria, RS

2023

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente minha mãe, que criou sozinha três filhos e enfrentou com garra todas as adversidades que cruzaram nossos caminhos. Obrigada por sempre me apoiar, me auxiliar em toda minha jornada acadêmica e estar sempre presente na minha vida.

Agradeço minhas professoras, Fernanda Silveira Flores Vogel e Juliana Felipetto Cargnelutti, pelos aprendizados e oportunidades durante todo o período que estive sobre suas orientações.

Agradeço à equipe do Laboratório de Doenças Parasitárias (LADOPAR) e Laboratório de Bacteriologia (LABAC), pelo conhecimento compartilhado e pelo auxílio no desenvolvimento do projeto. Agradeço em especial, meus amigos e colegas de pesquisa Fagner D'ambroso Fernandes, Eliesse Pereira Costa e Gilneia da Rosa, pela parceria, apoio e risadas, não tenho dúvidas que o caminho trilhado se tornou mais leve com a presença de vocês.

Agradeço a Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, pela oportunidade de realizar o mestrado em uma instituição de referência.

Agradeço ao apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), os quais possibilitaram a realização da pesquisa.

RESUMO

DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-*Trypanosoma* spp. EM BOVINOS DO RIO GRANDE DO SUL

AUTORA: Gisele Vaz Aguirre Samoel
ORIENTADORA: Fernanda Silveira Flores Vogel

A tripanossomose é uma importante doença para a produção de bovinos, no qual *Trypanosoma vivax* é a principal espécie causadora da doença na América do Sul. Essa enfermidade detém característica de ser crônica e debilitante, resultando em altos prejuízos econômicos que são complexos de serem estimados. A presença de anticorpos em rebanhos é frequentemente utilizada em estudos epidemiológicos e de distribuição geográfica desta doença, pois reflete a exposição prévia dos animais ao protozoário. Atualmente o Rio Grande do Sul (RS) é considerado uma região não-endêmica para *T. vivax*, e a espécie já foi descrita causando infecções naturais em bovinos e equinos da região central do estado, porém ainda não existem estudos de ocorrência ou dados epidemiológicos do parasitismo desta espécie em bovinos do estado. Em vista disso, o objetivo dessa pesquisa foi detectar a presença de anticorpos anti-*Trypanosoma* spp. em rebanhos bovinos do RS e sugerir quais as regiões intermediárias do estado podem ser consideradas áreas de risco para a transmissão de *T. vivax*. Para isto, foram analisadas 691 amostras de soro bovino provenientes do banco de soros do Laboratório de Doenças Parasitárias – UFSM, selecionadas conforme o número efetivo de bovinos do RS, e agrupadas conforme sua região intermediária de origem. O RS é subdividido em 7 regiões intermediárias denominadas: Uruguaiana, Santa Maria, Porto Alegre, Passo Fundo, Ijuí, Caxias do Sul, Santa Cruz do Sul, e Pelotas; A detecção de anticorpos foi realizada através da técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), utilizando formas tripomastigotas de *T. vivax* fixadas em lâmina. As amostras foram testadas na diluição de 1:80 e incubadas a 50 minutos a 37°C em câmara úmida e escura; o anticorpo secundário (Anti-IgG bovino) foi utilizado na diluição de 1:200, e incubado nas mesmas condições descritas. A soroprevalência geral de anticorpos Anti-*Trypanosoma* spp. nos bovinos foi de 24,6% (170/691) nas amostras analisadas. A taxa de detecção variou de 0% a 37% nas regiões de estudo, com maior prevalência na região intermediária de Ijuí (37,3%), Uruguaiana (30,7%) e Passo Fundo (28,9%), as quais foram sugeridas como áreas de risco para a tripanossomose bovina devido à alta soroprevalência detectada. As menores prevalências foram observadas em Pelotas (24,3%), Santa Cruz do Sul (23,0%), Porto Alegre (17,5%), Santa Maria (5,7%) e Caxias do Sul (0%). Um total de 24 rebanhos foram analisados, onde pelo menos uma amostra positiva foi detectada em 21 rebanhos (89,6%) e 3 rebanhos não apresentavam nenhuma amostra positiva (13,3%). Nos rebanhos positivos, a taxa de frequência de detecção variou de 4,2 a 63,6%. Esse é o primeiro estudo sorológico no Rio Grande do Sul a determinar o status de infecção por *Trypanosoma* spp. em bovinos, promovendo informações sobre a ocorrência e distribuição da tripanossomose bovina no estado.

Palavras-chave: Tripanossomose bovina. RIFI. IgG. Soroprevalência.

ABSTRACT

DETECTION OF ANTI-*Trypanosoma* spp. ANTIBODIES IN CATTLE OF RIO GRANDE DO SUL

AUTHOR: Gisele Vaz Aguirre Samoel
ADVISOR: Fernanda Silveira Flores Vogel

Trypanosomosis is an important disease for cattle production in which *Trypanosoma vivax* is considered the main species causing the disease in South America. This disease has characteristics of being chronic and debilitating, resulting in high economic losses that are complex to be estimated. The presence of antibodies in populations is often used for epidemiological studies and geographical distribution of this disease, because it reflects the presence of previous exposure of the animals to the protozoan. Currently, Rio Grande do Sul (RS) is considered a non-endemic region for *T. vivax*, and the species has already been described causing natural infections in cattle and horses in the central region of the state, but there are still no occurrence studies or epidemiological data on the parasitism of this species in cattle in the state. Therefore, the objective of this research was to detect the presence of anti-*Trypanosoma* spp. antibodies in cattle herds in RS and to suggest which intermediate regions of the state can be considered risk areas for the transmission of *T. vivax*. For this, 691 samples of bovine serum from the serum bank of the Laboratório de Doenças Parasitárias – UFSM were analyzed, selected according to the effective number of cattle in RS, and grouped according to their intermediate region of origin. The RS is subdivided into 7 intermediate regions named: Uruguaiana, Santa Maria, Porto Alegre, Passo Fundo, Ijuí, Caxias do Sul, Santa Cruz do Sul, e Pelotas; Antibody detection was performed using the Indirect Immunofluorescence Reaction (IFAT) technique, using trypomastigotes forms of *T. vivax* fixed on slides. The samples were tested at a 1:80 dilution and incubated for 50 minutes at 37°C in a humid and dark chamber; the secondary antibody (Anti-bovine IgG) was used at a dilution of 1:200, and incubated under the same conditions described. The overall seroprevalence of anti-*Trypanosoma* spp. in cattle it was 24.6% (170/ 691) in the analyzed samples. The detection rate ranged from 0% to 37% in the study regions, with a higher prevalence in the intermediate region of Ijuí (37.3%), Uruguaiana (30.7%) and Passo Fundo (28.9%), which were suggested as risk areas for bovine trypanosomosis due to the high seroprevalence detected. The lowest prevalences were observed in Pelotas (24.3%), Santa Cruz do Sul (23.0%), Porto Alegre (17.5%), Santa Maria (5.7%) and Caxias do Sul (0%). A total of 24 herds were analyzed, where at least one positive sample was detected in 21 herds (89.6%) and 3 herds had no positive sample (13.3%). In positive herds, the detection frequency rate ranged from 4.2% to 63.6%. This is the first serological study in Rio Grande do Sul to determine the infection status of *Trypanosoma* spp. in cattle, promoting information on the occurrence and distribution of bovine trypanosomosis in the state.

KEYWORDS: Bovine trypanosomosis. RIFI. IgG. Seroprevalence.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 – Formas tripomastigotas de *T. vivax* em esfregaço sanguíneo de bovino infectado.....18
- FIGURA 2 – Imagens de RIFI visualizadas em microscópio de fluorescência. A) Formas tripomastigotas de *T. vivax* apresentando fluorescência; Reação reagentes para a detecção de anticorpos anti-*Trypanosoma* spp. (amostra positiva). B) Reação não reagentes (amostra negativa).....20

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

18SrRNA	Gene 18S do RNA ribossômico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
ITS1	Espaço Transcrito Interno
OIE	Organização Mundial da Saúde Animal
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
RNA	Ácido ribonucleico
RS	Rio Grande do Sul
UFSM	Universidade Federal de Santa Maria
VSG	Glicoproteína de Superfície Variante

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1 ETIOLOGIA.....	13
2.1.1 <i>Trypanosoma vivax</i>	14
2.1.2 <i>Trypanosoma evansi</i>	15
2.1.3 <i>Trypanosoma theileri</i>	16
2.2 EPIDEMIOLOGIA.....	17
2.3 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL	18
2.3.1 Reação de Imunofluorescência Indireta.....	20
3 ARTIGO CIENTÍFICO.....	21
3.1 ARTIGO SUBMETIDO À REVISTA BRASILEIRA DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA.....	21
4 CONCLUSÃO.....	36
5 REFERÊNCIAS.....	37

1 INTRODUÇÃO

A tripanossomose animal é uma importante doença para bovinos, causada por protozoários do gênero *Trypanosoma*, no qual *Trypanosoma vivax* é considerado o principal agente etiológico na América do Sul em decorrência de sua patogenicidade e impactos consequentes na produção (RADOSTITS, 2006). A espécie é originária do continente Africano, onde juntamente com as outras espécies *T. congolense* e *T. brucei*, causam a Tripanossomíase Africana em bovinos (FIKRU, 2012). No Brasil, além do *T. vivax*, outras espécies podem infectar os bovinos sem causar ou causando poucos sinais clínicos, como a espécie, considerada não-patogênica, *T. theileri* e a espécie *T. evansi*, que frequentemente causa doença em equinos e caninos (RADOSTITS, 2006). Protozoários desse gênero são capazes de infectar uma grande variedade de animais domésticos e selvagens, como ovelhas, cabras, equinos e cervídeos, que desempenham uma importante função epidemiológica atuando como reservatórios da doença (DAVILA, 2003).

Os prejuízos econômicos decorrentes da doença incluem custos com tratamento curativo ou profilático, assistência veterinária e impactos diretos e indiretos no sistema de produção como a queda na produção de leite, perda progressiva de peso, abortos e infertilidades (GONZATTI, 2014). No continente africano essa doença é considerada a principal causa de doença em bovinos, e cursam com prejuízos econômicos estimados em US\$ 4,5 bilhões por ano (CONSTABLE, 2016). Neste continente a doença é endêmica, e o ciclo biológico inclui como vetores biológicos dípteras do gênero *Glossinia* sp., principalmente a mosca tsé-tsé, encontrada exclusivamente na África subsaariana (BOWMAN, 2010). O desenvolvimento de *T. vivax* ocorre na probóscida desses vetores, onde há a transformação das formas tripomastigotas em epimastigotas e em tripanosomas infectantes metacíclicos, que passam para a hipofaringe e infectam novos hospedeiros (TAYLOR, 2017).

No continente americano, *T. vivax* adquiriu a habilidade de ser transmitido mecanicamente por dípteras hematófagos como mutucas (*Tabanus* sp.) e moscas-do-estábulo (*Stomoxys calcitrans*), não possuindo capacidade de multiplicação nesses vetores (SILVA, 2003). Estes vetores são considerados de extrema importância na transmissão do agente, pois são capazes de potencializar a disseminação pelo hábito de realizar repasto sanguíneo, em pequenos intervalos de tempo, em mais de um hospedeiro (CONSTABLE, 2016). A transmissão iatrogênica é outra forma de infecção muito importante, que ocorre através do uso de seringas e agulhas compartilhadas, e pode ser a principal causa de disseminação da doença em rebanhos com essa prática de manejo (RADOSTITS, 2006).

O período pré-patente, que tem início na inoculação do parasito e término quando o parasita se torna detectável na corrente sanguínea do animal, varia de 2 a 10 dias, sem a ocorrência de sinais clínicos. A variação desse período está relacionada à quantidade de parasito no inoculado e à virulência do isolado (GONZATTI, 2014). Os sinais clínicos da tripanossomose bovina são inespecíficos e semelhantes aos de outras doenças parasitárias que cursam com desordens hemolíticas, como a babesiose e anaplasiose, e pode se manifestar forma de aguda, crônica ou assintomática (RADOSTITS, 2006). A fase aguda tem início com a presença de parasitos na corrente sanguínea e pode durar de 2 a 3 meses, onde há a ocorrência de febre transitória que coincide com os picos de parasitemia, ocorrendo a cada 8 a 15 dias. A anemia é frequentemente observada nessa fase, podendo variar de moderada a severa, decorrente da queda de eritrócitos na circulação pelo sequestro por marcação antigênica. Outros sinais clínicos incluem lacrimejamento, edema sub-mandibular, descargas nasais, perda de peso progressiva, letargia e queda na produção de leite (GONZATTI, 2014).

Em casos mais graves, sinais neurológicos como paresia dos membros e incoordenação, também podem ser observados (RADOSTITS, 2006). A severidade da doença depende de diversos fatores como a espécie e cepa envolvida, resposta imune e nível de resistência do hospedeiro, com taxas de mortalidade variando entre 3 a 50% (RADOSTITS, 2006; GONZATTI, 2014). A doença também está relacionada à problemas reprodutivos e consequente infertilidade nos animais acometidos. Nos machos infectados, pode haver total inibição da espermatogênese com degeneração testicular e epididimal que resultam em infertilidade e esterilidade, e nas alterações na motilidade e qualidade do sêmen. Nas fêmeas, *T. vivax* induz lesões genitais, anestro transitório ou permanente, ciclos anormais e altas incidências de abortos (GONZATTI, 2014).

A fase crônica ocorre em 2 a 3 meses após a infecção, nos animais que sobreviveram à fase de fase aguda da doença, estes animais mantêm níveis estáveis de parasitemia circulante no sangue, mas recuperam os parâmetros clínicos normais e tornam-se assintomáticos. Entretanto, quando submetidos a diferentes tipos de estresse (restrição alimentar, estresse térmico, gestação, etc.), há o reaparecimento da parasitemia e dos sinais clínicos do período agudo (GONZATTI, 2014).

Muitos bovinos podem apresentar infecção subclínica durante toda a vida, e são importantes reservatórios do protozoário dentro de uma população, por isso, a translocação e introdução desses animais em novos rebanhos representa um fator muito importante para a dispersão territorial da doença de áreas endêmicas para não-endêmicas (VENTURA, 2001;

DAVILA, 2003). Nestes animais, a doença pode ser reativada quando desencadeada por estresses como transporte, escassez alimentar, estresse térmico, gestação ou outro fator imunossupressor, com isso, há o reaparecimento da parasitemia e dos sinais clínicos do período agudo (GONZATTI, 2014; GARCIA, 2016). Por ser uma doença imunossupressiva, frequentemente é acompanhada por outras infecções hemoparasitárias ou bacterianas que intensificam o estado clínico do animal e dificultam o diagnóstico (GONZATTI, 2014; CONSTABLE, 2016).

O diagnóstico da tripanosomose bovina deve incluir as alterações clínicas dos animais, juntamente com resultados de técnicas parasitológicas, moleculares ou sorológicas. Métodos parasitológicos diretos são os mais simples e utilizados, consistem na observação direta das formas tripomastigotas no sangue, através de microscopia óptica, porém por possuir baixa sensibilidade, esta técnica tem a limitação de ser recomendada somente em casos agudos da doença, onde a parasitemia é alta (GONZATTI, 2014). A identificação de espécie nesta metodologia exige experiência prática, uma vez que é necessário avaliar as características morfológicas das formas tripomastigotas do parasito (TAYLOR, 2017).

As técnicas sorológicas são frequentemente utilizadas em pesquisas epidemiológicas, sendo usual a utilização de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) indireto. Estes testes são considerados técnicas indiretas de diagnóstico, pois a sua finalidade não é a detecção do parasito em si, mas sim a identificação de anticorpos específicos que estarão presentes no soro do animal que possuiu contato com o agente etiológico (TIZARD, 2014).

Os estudos sorológicos sobre a ocorrência do agente na população bovina auxiliam na compreensão da distribuição geográfica em determinada região. Na América do Sul, esses estudos são realizados majoritariamente em áreas endêmicas como na região do pantanal e região amazônica (MADRUGA, 2006), e apesar de *T. vivax* ter sido detectado infectando naturalmente bovinos (SILVA, 2009) e equinos (DA SILVA, 2011) no Rio Grande do Sul, ainda não existem estudos de ocorrência ou dados epidemiológicos do parasitismo desta espécie em bovinos no estado. Em termos epidemiológicos, vários fatores contribuem para que possa haver a manutenção e dispersão desses agentes no estado: o clima favorável para o desenvolvimento de vetores mecânicos, a presença de grandes populações de rebanhos bovinos, a importação de animais de outras regiões brasileiras, e relatos de infecções por *T. vivax* em diversas regiões territorialmente vizinhas ao estado.

Em vista disso, informações precisas sobre a ocorrência e distribuição da enfermidade no estado são necessárias para estabelecer as regiões de risco, visando futuramente identificar os fatores epidemiológicos relacionados à doença para desenvolver estratégias de controle. Desta forma, o objetivo desta pesquisa foi detectar a presença de anticorpos anti-*Trypanosoma* spp. em rebanhos bovinos do RS e sugerir quais as regiões intermediárias do estado podem ser consideradas áreas de risco para a transmissão de *T. vivax*; com isso, o presente estudo se faz relevante para o monitoramento do agente nos rebanhos do Rio Grande do Sul, a fim de contribuir para estudos epidemiológicos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ETIOLOGIA

Tripanosomas são protozoários flagelados pertencentes à classe *Kinetoplastida*, ordem *Trypanosomatida*, família *Trypanosomatidae*. São encontrados no sangue e em alguns tecidos de mamíferos (incluindo os humanos) e são transmitidos principalmente por insetos hematófagos nos quais a transmissão pode ser cíclica ou não cíclica, com exceção *T. equiperdum* que possui unicamente a via de transmissão venérea (TAYLOR, 2017; GONZATTI, 2014).

Na transmissão cíclica, são agrupados em 2 seções: *Salivaria*, com desenvolvimento na parte anterior do trato digestivo, e *Stercoraria*, onde o desenvolvimento ocorre na parte posterior do trato digestivo. No grupo denominado *Salivaria*, os tripanosomas se multiplicam na probóscide e sistema digestivo do inseto, de modo que a transmissão ocorre com a inoculação das formas infectantes durante o repasto sanguíneo. As espécies com essas características incluem as causadoras da tripanossomose africana, que são transmitidas pela mosca Tsé-Tsé: *T. (Nannomonas) congolense*, *T. (Trypanozoon) brucei brucei* e *T. (Duttonella) vivax* (TAYLOR, 2017; GONZATTI, 2014).

Nas espécies que são agrupadas no grupo *Stercoraria*, a multiplicação e transformação ocorrem no intestino, e as formas infectantes migram para o reto e são excretados nas fezes. Esse grupo engloba algumas espécies descritas como não patogênicas, como *T. theileri* e *T. melophagium*, que parasitam bovinos e ovinos respectivamente, e outras notavelmente patogênicas como *T. cruzi*, importante causadora de doenças em animais e humanos.

Na forma não-cíclica, a transmissão é unicamente mecânica, os tripanosomas são transferidos de um hospedeiro a outro através da probóscide do inseto durante o repasto sanguíneo, juntamente com a saliva e o sangue contaminado, não há qualquer tipo de

multiplicação do parasito no inseto e sua sobrevivência no interior da probóscide ocorre por poucas horas, assim como a sua possibilidade de transmissão a outro animal (TAYLOR, 2017).

2.2.1 *Trypanosoma vivax*

Trypanosoma vivax é um protozoário do Subgênero *Duttonella* pertencente à seção *Salivaria*. Este protozoário parasita principalmente o sistema vascular e é incapaz de invadir células, multiplicando-se apenas por divisão binária no sangue. Seu principal mecanismo de evasão do sistema imune é a mudança da sua Glicoproteína de Superfície Variável (VSG) na membrana no celular, o que resulta em parasitemia recidivante e conseqüentemente em sinais clínicos remitentes, o que favorece a transmissão do parasita. Essa é a única espécie de *Trypanosoma* com duplo modo de transmissão: biológica por meio da mosca Tsé-Tsé na África Subsaariana e mecânica por insetos hematófagos da América Central, América do Sul e em algumas partes da África (GONZATTI, 2014).

A espécie *T. vivax* é endêmica do continente africano, e foi introduzida na América Latina em um bovino importado da África, onde encontrou diversos hospedeiros suscetíveis e se disseminou por quase todos os países América Central e do Sul. Foi primeiramente descrito em um bovino com sinais clínicos de edema, na Guiana Francesa em 1919, e posteriormente identificado na Venezuela, Guadalupe, Martinica, Colômbia, Suriname, Panamá, Guiana, Bolívia, Peru e Brasil (JONES E DAVILA, 2001; DAVILA E SILVA, 2006).

Na América do Sul, há registros de *T. vivax* em 10 países, incluindo Colômbia, Venezuela, Guiana Francesa, Bolívia, Peru e Brasil (JONES E DAVILA, 2001). No Brasil, o primeiro registro do agente ocorreu em búfalos da região amazônica, no estado do Pará (SHAW E LAINSON, 1972), e com o passar dos anos foram sendo registrados diversos casos de infecções em rebanhos bovinos de diferentes regiões, e atualmente quase todos os estados brasileiros relatam a ocorrência dessa espécie em bovinos ou bubalinos, sendo que o Pantanal e algumas regiões pertencentes à floresta amazônica são consideradas endêmicas para o parasito (RADOSTITS, 2006).

No Brasil, alguns fatores que podem ter contribuído com a expansão geográfica de *T. vivax* incluem a alta prevalência na região do Pantanal brasileiro, o crescimento do tráfego animal e a possibilidade de transmissão iatrogênica em decorrência do programa de vacinação contra a Febre Aftosa (GONZATTI, 2014). Este protozoário infecta principalmente bovinos, e em menor frequência, equinos (DA SILVA, 2011), fator que aumenta seu potencial de dispersão

geográfica e estabelecimento enzoótico principalmente em locais que utilizam equinos no trabalho rural (DESQUESNES, 2013a).

As cepas de *T. vivax* podem apresentar níveis variáveis de virulência e patogenicidade, principalmente quando são comparadas as cepas do Velho e do Novo Mundo. Estudos demonstram que os isolados de *T. vivax* da América do Sul possuem maior semelhança genética com isolados do Oeste da África, os quais são descritos causando infecções agudas e acompanhadas de perda de peso, redução da produção de leite, abortos e mortalidade. Enquanto que, os isolados do Leste Africano, tendem a produzir infecções mais brandas ou auto limitantes em animais saudáveis (GARDINER E MAHMOUD, 1992; CORTEZ, 2006).

Na América do Sul, os isolados de *T. vivax* são geneticamente homogêneos e bem relacionados entre si, onde bovinos infectados com um mesmo isolado ou com isolados semelhantes, podem apresentar doenças distintas ou serem completamente assintomáticos (CORTEZ, 2006). As cepas da América do Sul possuem uma diversidade antigênica mais limitada do que as cepas do continente Africano, em decorrência da ausência de reprodução sexuada em um vetor biológico, e isso pode levar por consequência ao estabelecimento da estabilidade endêmica com o passar do tempo, que é caracterizada por altas taxas de infecções com baixas taxas de doença (DIRIE 1993; JONES E DAVILA, 2001). Atualmente, na América do Sul, *T. vivax* é encontrado em equilíbrio enzoótico no Pantanal e em áreas da floresta amazônica (VENTURA, 2001; DAVILA, 2003), onde a soroprevalência nos bovinos é extremamente alta, podendo chegar em valores de 93.1% a 98.5% (GUEDES-JUNIOR, 2008; DE MELLO, 2019).

2.2.2 *Trypanosoma evansi*

T. evansi é um tripanosoma salivariano pertence ao subgênero *Trypanozoon*, um grupo constituído de espécies que são agentes etiológicos de humanos e causadores de doenças em animais domésticos e selvagens. Essa espécie possui um modo de transmissão exclusivamente mecânico por tabanídeos e moscas de estábulo (*Stomoxys* sp.), o que permitiu que se disseminasse por todo o mundo (GONZATTI, 2014), onde atualmente é encontrado principalmente em áreas tropicais e subtropicais com a presença de vetores. Esta espécie tem como “ancestral” *T. brucei*, que possui uma distribuição geográfica limitada aos locais endêmicos para mosca Tsé-tsé na África Subsaariana, pois necessitam dela no seu ciclo, diferente do que ocorre em *T. evansi*, onde em decorrência da perda do seu material genético o

parasita perdeu a habilidade de completar seu ciclo nesse vetor, o que provavelmente selecionou os com melhores habilidades de transmissão mecânica (DESQUESNES, 2013a).

Essa espécie é o agente etiológico de doença aguda conhecida como “Surra” ou “Mal de Cadeiras”, que afeta principalmente equinos e caninos (DESQUESNES 2013a). Além destes hospedeiros, essa é a espécie que possui maior capacidade de infectar diversos hospedeiros, e que exibem efeitos clínicos muito variáveis e dependentes de vários fatores, o que torna esse agente um causador de uma doença caracterizada como multiespecífica e polimórfica.

Na América Latina, *T. evansi* é considerado um agente pouco patogênico para bovinos, causando doença branda, crônica ou assintomática, onde é relatado inclusive a dificuldade de infectar animais experimentalmente. Sendo assim, o bovino pode ser considerado potencial reservatório para esta espécie no novo mundo, mas também há autores que consideram que possam ser refratários à infecção por esta espécie. Em contraste, no continente Asiático, *T. evansi* é capaz de causar doença aguda em bovinos de leite e de corte, causando febre, queda no hematócrito, perda de peso e queda na produção de leite, podendo algumas vezes causar sinais neurológicos e levar o animal à morte (DESQUESNES, 2013b).

2.2.3 *Trypanosoma theileri*

T. theileri pertence ao subgênero *Megatrypanum*, cuja transmissão ocorre de maneira mecânica e/ou biológica pelos mesmos vetores hematófagos citados anteriormente. É geralmente considerado um tripanosoma não patogênico ou pouco patogênico, que causa baixa parasitemia ou infecção latente em animais domésticos, em níveis não detectáveis em testes moleculares ou parasitológicos (SOOD, 2011). Essa característica de patogenicidade está relacionada com a capacidade de *T. theileri* conseguir sobreviver no sangue dos animais infectados sem ser reconhecido como estranho, porque permanecem cobertos com proteínas séricas do hospedeiro (TIZARD, 2014).

Apesar de ser considerado não-patogênico nos animais da América do Sul, no continente asiático essa espécie vem sendo descrita causando doença com sinais clínicos em animais em gestação e em co-infecções com outros patógenos (SOOD, 2011, AMATO, 2019), podendo inclusive invadir tecidos e órgãos do sistema nervoso e causar encefalite (BRAUN, 2002). Além disso, estudos recentes descrevem alterações subclínicas e impactos na produtividade de bovinos leiteiros infectados por esta espécie (SUGANUMA, 2022).

2.2 EPIDEMIOLOGIA

O protozoário *T. vivax* foi introduzido na América Central e do Sul através de bovinos infectados que foram importados da África durante a colonização europeia (JONES E DÁVILA, 2001). No continente americano, essa espécie se adaptou aos vetores e hospedeiros presentes nele, o que permitiu sua disseminação entre diversas espécies animais e sua ampla distribuição geográfica nesse território (DÁVILA et al., 2003). Há diversos fatores que contribuem para a permanência e disseminação e ocorrência de surtos em uma localidade, dentre eles abundância de vetores mecânicos e a entrada ou importação de animais infectados em um rebanho livre da doença (BATISTA et al., 2008).

Os fatores ambientais contribuem para o desenvolvimento e manutenção dos vetores de *T. vivax*, deste modo, locais com temperatura e umidade favoráveis aos vetores, durante todo o período do ano, são locais mais propensos se tornarem locais enzoóticos para a doença, uma vez que o protozoário foi introduzido em uma população suscetível. Atualmente, regiões do Pantanal e da floresta amazônica são consideradas endêmicas para tripanossomose bovina, e são locais caracterizados por terem um clima quente e úmido durante todo o ano (HERRERA et al., 2004). Em locais que não possuem condições favoráveis de umidade e temperatura para o desenvolvimento de vetores, de maneira constante durante todos os períodos do ano, como locais que possuem secas extrema (nordeste), a doença tende a ocorrer em forma de surtos em períodos do ano que as condições sejam propícias para o desenvolvimento dos vetores (BATISTA et al., 2007).

O fato de *T. vivax* infectar diversas espécies, torna a proximidade de animais silvestres e domésticos, que podem ser reservatório e/ou estarem infectados por *T. vivax*, outro fator importante na disseminação da doença. Os bubalinos e bovinos zebuínos muitas vezes podem ser clinicamente saudáveis, e estarem infectados pelo protozoário, estes animais são descritos por apresentarem relevantes taxas de infecção nos rebanhos (PÉREZ et al., 2020). O equino é outra espécie doméstica que pode atuar como reservatório da doença, e muitas vezes é criada em coabitação com bovinos (SUGANUMA et al., 2022). Também é descrita a infecção natural em outros animais domésticos como asnos, ovelhas, cabras e porcos. Dentre as espécies selvagens, já foram identificadas mais de 39 espécies com a presença de *T. vivax*, o que demonstra que o protozoário também mantém reservatórios no ciclo silvestre (FETENE et al., 2021). Algumas espécies que são consideradas reservatório da doença, por vezes também podem adoecer e apresentar sinais clínicos quando submetidos ao estresse ou doenças concomitantes.

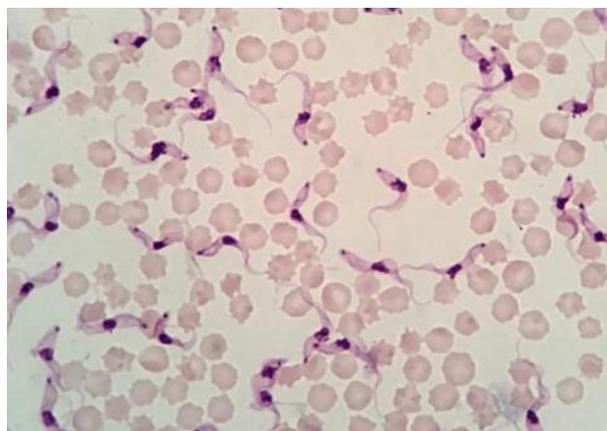
De maneira geral, os protozoários são transferidos mecanicamente de um mamífero a outro por meio dos vetores, porém, a transmissão por via iatrogênica, através do compartilhamento de agulhas e instrumentos, também é um importante fator epidemiológico na disseminação da doença dentro de rebanhos, ocorrendo geralmente durante a aplicação de vacinas ou de medicamentos no rebanho (VIERA et al., 2017; PEREIRA et al., 2018).

2.3 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico de tripanossomose é complexo, pois muitas vezes o teste de diagnóstico laboratorial depende da fase da doença em que o animal se encontra. Na fase aguda da doença, onde há alta parasitemia e conseqüentemente uma grande quantidade de formas tripomastigotas circulantes, o diagnóstico pode ser realizado pela detecção do protozoário através de técnicas simples como o esfregaço sanguíneo e técnica de Woo (WOO, 1970) ou Brener (BRENER, 1961; OSÓRIO, 2008). Através desta técnica direta, é possível verificar características morfológicas do protozoário que estão relacionadas com a espécie, como tamanho e formato da tripomastigota, posição do núcleo e cinetoplasto, flagelo e grau de desenvolvimento da membrana ondulante (TAYLOR, 2017).

Apesar de ser uma metodologia simples e de baixo custo, nesta técnica a sensibilidade é dependente da parasitemia, o que não é favorável ao diagnóstico, pois a parasitemia em animais infectados é muito variável, principalmente em animais com infecções crônicas, onde há poucas formas tripomastigotas circulantes, muitas vezes a níveis indetectáveis. Então, pelo conhecimento da característica de cronicidade desta doença, torna-se necessária a realização de técnicas mais sensíveis como as análises moleculares ou sorológicas (RADOSTITS, 2006).

Figura 1 – Formas tripomastigotas de *T. vivax* em esfregaço sanguíneo de bovino infectado.



Fonte: Bastos et al., 2017.

Através de técnicas moleculares, como a de PCR (*polymerase chain reaction*) é possível detectar animais positivos e com baixa parasitemia, pois essas técnicas visam a detecção do DNA do protozoário na amostra analisada, para isso há amplificação específica de um segmento de DNA, que é definida pelos *primers* utilizados na reação. Essa técnica tem a vantagem de ser altamente sensível e espécie-específica; além disso, através dela é possível compreender a diversidade genética e suas relações filogenéticas com outros tripanosomas Africanos ou da América do Sul (GONZATTI, 2014).

Outra vantagem nesta técnica é a possibilidade de identificação co-infecções, quando mais de uma espécie pode ser encontrada parasitando o mesmo hospedeiro. A identificação da espécie é importante, uma vez que a simples presença de um *Trypanosoma* patogênico pode ser suficiente para a decisão de tratamento, enquanto a identificação de espécies, sub-espécies, tipo, ou isolado pode ser necessária para propósitos sanitários, taxonômicos, epidemiológicos ou fins de pesquisa (DESQUESNES E DÁVILA, 2002). Neste, os marcadores genéticos mais frequentemente utilizados são baseados no gene que codifica a região 18SrRNA, região da cisteína protease (Catepsina L-like), ou no locus ITS1 do RNA ribossomal (PIMENTEL et al., 2012; DESQUESNES E DÁVILA, 2002). Apesar de suas vantagens, essas técnicas demandam material e equipamentos de custo elevado que não estão disponíveis na maioria dos laboratórios, além disso, a sensibilidade dos testes também é dependente do nível da parasitemia e podem ocorrer resultados falso-negativos (DESQUESNES e DAVILA, 2002).

As técnicas sorológicas são frequentemente utilizadas para estudos epidemiológicos e de distribuição geográfica da doença, utiliza como princípio a pesquisa de anticorpos contra o agente, possui a vantagem de a sensibilidade dos testes não ser influenciada pelos níveis de parasitemia circulante e permitir a diferenciação entre os estágios agudos (IgM) e crônicos (IgG), quando pesquisadas as classes imunoglobulinas características de cada fase da doença (RADOSTITS, 2006; GONZATTI, 2014).

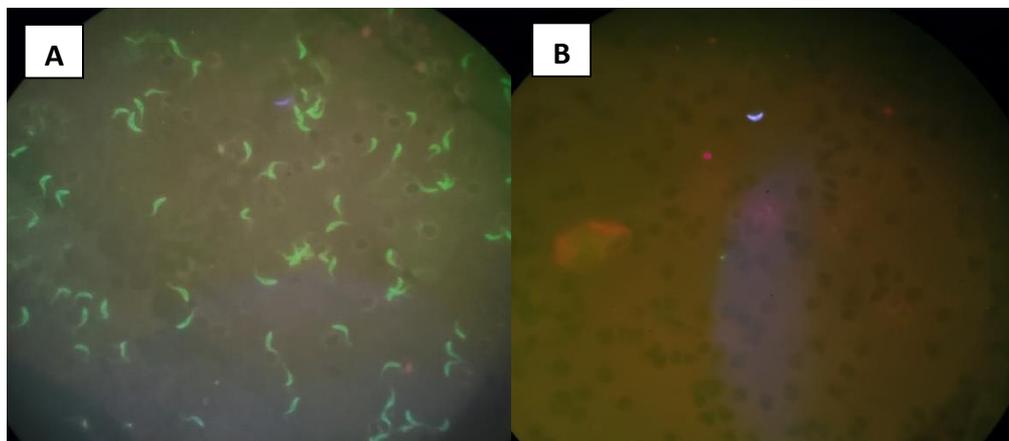
As evidências sorológicas para os tripanosomas são obtidas pela demonstração de respostas inflamatórias, por anticorpos específicos ou por antígenos específicos no hospedeiro. Os testes sorológicos, como a RIFI, são métodos consolidados para a identificação de anticorpos contra esse protozoário (OIE, 2018), sendo esta uma das primeiras técnicas sorológicas padronizadas e aplicada para estudos da doença na América do Sul para diagnóstico de tripanossomose bovina (PLATT E ADAMS, 1976; KATENDE, 1987), sendo amplamente utilizada até os dias atuais.

2.3.1 Reação de Imunofluorescência Indireta

A RIFI é uma técnica de diagnóstico indireta porque visa identificar anticorpos específicos presentes no soro. A execução da técnica consiste na utilização do antígeno, que deve ser primeiramente fixado em lâmina, onde posteriormente é incubado com soro suspeito de conter anticorpos contra este antígeno. Após a incubação, o soro é lavado, deixando apenas os anticorpos específicos ligados ao antígeno. Estes anticorpos ligados serão detectados através de uma antiglobulina marcada com Isotiocianato de fluoresceína (FITC), que é incubada nas mesmas condições da etapa anterior, e posteriormente lavada para a remoção das antiglobulinas não ligadas (TIZARD, 2014).

Sendo assim, quando a lâmina é observada sob microscópio de fluorescência, a presença de fluorescência indica que a antiglobulina marcada foi ligada ao anticorpo presente no soro testado, e a ausência de fluorescência indica que não houve a ligação da antiglobulina com o anticorpo no soro testado, como observado na Figura 2.

Figura 2 – Imagens de RIFI visualizadas em microscópio de fluorescência. A) Formas tripomastigotas de *T. vivax* apresentando fluorescência; Reação reagente para a detecção de anticorpos anti-*Trypanosoma* spp. (amostra positiva). B) Reação não reagente (amostra negativa).



Esta técnica possui a vantagem de ser simples e não-dependente da parasitemia do animal. É uma técnica mais recomendada para a identificação de animais em estado crônico da doença, ou que já tiveram contato anterior com o antígeno por tempo suficiente para a produção de anticorpos, e é amplamente utilizada em pesquisas de anticorpos anti-*Trypanosoma vivax* em bovinos de diversas regiões no Brasil.

A interpretação do resultado do exame sorológico deve ser cautelosa, uma vez que presença de anticorpos não pode ser interpretada como absoluta evidência de infecção, pois a persistência de anticorpos pode ocorrer por diversos meses depois da cura espontânea ou medicamentosa dos animais infectados (DELAFOSSÉ et al., 2006). Além disso, a ausência de anticorpos não pode ser sempre associada a ausência de infecção, porque alguns animais podem ser sorologicamente negativos enquanto apresentarem alta parasitemia (BOSSARD et al., 2010). Esse fenômeno já foi reportado por AUTHIÉ et al. (1993) e pode estar relacionado a adsorção de anticorpos por tripomastigotas (antígenos) circulantes. Assim, todos esses pontos representam um problema quanto ao diagnóstico da doença, o que pode resultar na prática em casos de infecções não reportadas e/ ou confundidas com outras doenças que cursam com desordens hemolíticas, neurológicas ou reprodutivas.

3. ARTIGO CIENTÍFICO

3.1 Artigo submetido à Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária

Detection of anti-*Trypanosoma* spp. antibodies in cattle of southern Brazil

Detecção de anticorpos anti- *Trypanosoma* spp. em bovinos do sul do Brasil

Detection of anti-*Trypanosoma* spp. in cattle

Abstract

Bovine trypanosomosis, caused for by *Trypanosoma vivax*, is a disease imported from African continent, with territorial expansion in several South American countries, where currently affects cattle in almost all Brazilian states. Despite the reports on *T. vivax* infections in southern Brazil, there is currently no data on the circulation status of the pathogen. In this study, we aimed detect anti-*Trypanosoma* spp. IgG antibodies in cattle of Rio Grande do Sul and suggest possible risk areas for *T. vivax* transmission in the region under study. A total of 691 blood serum samples from cattle in the intermediate regions of Rio Grande do Sul were analyzed by indirect immunofluorescence assay (IFA). The overall seroprevalence of anti-*Trypanosoma* antibodies in cattle was 24.6% (170/691). The detection rate ranged from 0–37.3% in the region under study, with a higher prevalence in the intermediate regions of Ijuí (37.3%), Uruguiana (30.7%), and Passo Fundo (28.9%). These regions were suggested as possible as risk areas for bovine trypanosomosis due to the high seroprevalence detection. This is the first serological study in Rio Grande do Sul to determine *Trypanosoma* spp. infection status in cattle, providing data on the epidemiology of trypanosomosis in the state.

Keywords: *Trypanosoma vivax*, serological diagnosis, epidemiology

Resumo

A tripanossomose bovina, causada por *Trypanosoma vivax*, é uma doença importada do continente Africano, com expansão territorial em diversos países sul-americanos, onde atualmente afeta bovinos em quase todos os estados brasileiros. Apesar de infecções por *T. vivax* serem reportadas no sul do Brasil, não há registros do status da circulação do patógeno. Nesse estudo, tivemos como objetivo a detecção de anticorpos IgG anti-*Trypanosoma* spp. em bovinos do Rio Grande do Sul e sugerir possíveis áreas de risco para a transmissão de *T. vivax* na região de estudo. Foram analisadas, por meio de Imunofluorescência Indireta (IFI), 691 amostras de soro de bovinos das regiões intermediárias do Rio Grande do Sul. A soroprevalência geral de anticorpos anti-*Trypanosoma* nos bovinos foi 24.6% (170/691). A taxa de detecção variou de 0–37.3% na região de estudo, com maior prevalência na região intermediária de Ijuí (37.3%), Uruguaiana (30.7%), e Passo Fundo (28.9%). Essas regiões foram sugeridas como possíveis áreas de risco para a tripanossomose bovina devido à alta soroprevalência. Esse é o primeiro estudo sorológico no Rio Grande do Sul a determinar o status de infecção por *Trypanosoma* spp. em bovinos, fornecendo dados sobre a epidemiologia da tripanossomose no estado.

Palavras-chave: *Trypanosoma vivax*, diagnóstico sorológico, epidemiologia

Introduction

Trypanosomes are flagellate protozoans belonging to the family *Trypanosomatidae* and genus *Trypanosoma*. Various parasitical species belonging to *Trypanosoma*, such as *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma congolense*, *Trypanosoma evansi*, and *Trypanosoma vivax*, cause trypanosomosis, a livestock disease prevalent in Africa, Latin America, and Asia (Stevens & Brisse, 2004). In South America, *T. vivax* is the most important causative agent of trypanosomosis in cattle, causing losses in the cattle industry by being a wasting disease. Other species, such as non-pathogenic *T. theileri* and *T. evansi*, also infect cattle but rarely cause diseases (Radostitis et al., 2006). Economic losses in Brazilian cattle-rearing are associated with animal mortality following outbreaks, and indirect interferences of subclinical and undiagnosed infections that reduce weight gain and milk production as well as cause abortion, infertility, and other disorders, thus implicating livestock productivity (Otte et al., 1994; Seidl et al., 1999; Jones & Dávila, 2001).

Trypanosoma vivax is a blood parasite endemic to Africa, was introduced in Latin America through infected cattle imported from Africa and has spread across several countries

(Jones & Dávila, 2001). *T. vivax*-mediated bovine trypanosomosis was first reported in the Amazon region of Brazil: in buffalos from Pará (Shaw & Lainson, 1972) and cattle from Amapá (Serra-freire, 1981). Subsequently, infections in cattle herds occurred with increasing frequency, with reported *T. vivax* within other states in the North (Linhares et al., 2006), Northeast (Batista et al., 2007; Guerra et al., 2013; Lopes et al., 2018), Midwest (Silva et al., 1996; Osório et al., 2008), Southeast (Carvalho et al., 2008; Cadioli et al., 2012), and South Brazil (Silva et al., 2009). Currently, *T. vivax* is considered endemic in some Pantanal and Amazon rainforest regions.

African dissemination of *T. vivax* includes cyclical transmission by *Glossina* spp., with *T. vivax* developing in their digestive tract. Since *Glossina* spp. is absent in South America, the major transmission methods include non-cyclical or mechanical transmission by blood-sucking flies (Otte & Abuabara, 1991) such as tabanids (horseflies) and *Stomoxys calcitrans* (stable flies). Although not confirmed, it is still possible that cyclical transmission exists by one or more vector species (Otte & Abuabara, 1991; Wells, 1982). Furthermore, iatrogenic transmission through fomites and transplacental infections have also been described (Cadioli et al., 2012). A large diversity of domestic and wild species can be infected by *Trypanosoma vivax* and act as important reservoirs, including sheep, goats, horses, and cervids (Dávila et al., 2003).

Within South American regions, *T. vivax* infection manifests variable levels of virulence and pathogenicity (Gardiner & Mahmoud, 1992), causing non-specific clinical signs, such as severe anemia, weight loss, edema, immunosuppression, and reproductive failure. Some acute cases can develop various neurological disorders that eventually cause the death of the affected animals (Gonzatti et al., 2014). Asymptomatic and chronic infections are common in cattle from endemic regions and can be reactivated by nutritional and physical stress, concomitant disease, pregnancy, and lactation (Garcia et al., 2016). No single clinical sign is pathognomonic, and the disease may simulate many other infections (Buscher, 2014), therefore, it is easily overlooked or confused with other diseases.

In southern Brazil, despite reports of *T. vivax* infection in cattle (Silva et al., 2009) and naturally infected horses (Da Silva et al., 2011), no data on pathogen circulation status in Rio Grande do Sul (RS) have been recorded. RS borders areas that extensively breed cattle for animal trafficking and/or importation, which favors disease spread. Thus, understanding the actual circulation of *T. vivax* in RS is important. This study aimed to detect anti-*Trypanosoma* spp. antibodies in cattle in the regions of RS and elucidate the trypanosomosis transmission risk areas in the region under study.

Materials and methods

A total of 691 serum samples were obtained from the sera bank of Laboratório de Doenças Parasitárias of Universidade Federal de Santa Maria (LADOPAR/UFSM) from 2020–2022. Samples were from taurine (*Bos taurus*), zebu (*Bos indicus*), and crossbreed cattle, located in the intermediate regions of RS, Uruguaiiana, Santa Maria, Porto Alegre, Passo Fundo, Ijuí, Caxias do Sul, Santa Cruz do Sul, and Pelotas (IBGE, 2017). The total number of samples was determined based on statistical analysis using the Epi Info (v7.2.5) system, according to the cattle population of RS (IBGE, 2022). The confidence interval was estimated to be 95%, with a standard error of 3%.

Indirect immunofluorescence assay (IFA) described by Camargo (1966) was used to detect IgG antibodies against *Trypanosoma* spp. with some modifications. Briefly, IFA was performed using a microscopic strain infected with *T. vivax* trypomastigotes. The serum samples were diluted in phosphate buffered saline (pH 7.2) to 1:80 (Cuglovici et al., 2010). Commercial fluorescein-labeled anti-bovine IgG[®] (Rabbit Anti-Bovine IgG FITC[®], F7884, Sigma Bio Sciences, St. Louis, Missouri, USA) secondary antibody was diluted to 1:400. The samples were incubated with both the primary and secondary antibodies for 50 min at 37 °C in a dark and humid chamber. Confirmed positive and negative serum samples diluted to 1:80 were used as controls. The slides were observed at 400× magnification under a fluorescence microscope (Optiphase INV403F). The samples were considered reactive when the trypomastigotes revealed total fluorescence, showing binding between the FITC-labeled secondary antibody and the antigen–antibody complex. Serum that did not show fluorescence was considered non-reactive.

Results

Anti-*Trypanosoma* spp. IgG was detected in 24.6% (170/691) cattle serum samples. The detection rate ranged from 0–63.6% in the study region (Table 1), with a higher prevalence in the intermediate regions of Ijuí (37.3%), Uruguaiiana (30.7%), and Passo Fundo (28.9%). The lowest prevalence was observed in Pelotas (24.3%), Santa Cruz do Sul (23.0%), Porto Alegre (17.5%), Santa Maria (5.7%), and Caxias do Sul (0%) (Fig. 1).

A total of 24 herds were sampled: 9/24 were dairy cattle, 5/24 beef cattle, and 10/24 did not report this information. At least one positive sample was detected in 21 herds (89.6%) and the remaining 3 had no positive samples (13.3%). In the positive herds, the detection frequency

ranged from 4.2–63.6%. The highest frequencies of detection were observed in three dairy herds from Passo Fundo (63.6%, 7/11; 46.1%, 6/13; 45.4%, 10/22), one herd from Porto Alegre (39.1%, 9/23), and one herd from Pelotas (39.3%, 22/56) (Table 1).

Discussion

Trypanosomosis, caused by *T. vivax*, is considered a non-endemic disease in cattle in southern Brazil. Currently, this species is only considered endemic in some Pantanal and Amazon rainforest regions. However, it sporadically infects various species throughout southern Brazil regions. *T. vivax* infects cattle and horses with clinical signs in the central cities of RS (Silva et al., 2009; Da Silva et al., 2011). Nevertheless, since serological studies have not been performed using serum samples collected in RS, no data on cattle trypanosomosis in RS is available. This is the first bovine serological study on anti-*Trypanosoma* spp. antibody detection and frequency among all regions of RS, highlighting the importance of widespread disease-causing pathogen analysis for the differential diagnosis of agents that cause hemolytic, neurological, or reproductive disorders.

Though RS is not a *T. vivax* endemic region, the presence of anti-*Trypanosoma* spp. antibodies over almost all intermediate regions (7/8) indicated that trypanosomes have spread throughout the cattle from RS and may be associated with symptomatic or asymptomatic infections in beef and dairy herds. According to these findings, there is a risk of trypanosomosis outbreaks in the state, mainly in the cities of intermediate regions with high seroprevalence detection. The presence of vectors and favorable conditions for their development (mainly *S. calcitrans*), food restriction, inadequate transport conditions, and thermal stress in dairy cattle herds is associated with the needle-sharing practice during oxytocin application in lactating cows; these factors, among other, favor disease epidemiology in cattle herds in Brazil (Cadioli et al., 2012).

The detection rate in RS (24.6%) is lower than that in endemic areas such as the Pantanal and Amazon rainforests, in which a high frequency of seropositive cattle to *T. vivax* (93.1–98.5%) have been observed (Guedes Junior et al., 2008; De Mello et al., 2019). However, it is higher than in areas of enzootic instability for *T. vivax*, whose frequencies of antibodies varied from 11.90–15.99% (Guerra et al., 2013). Seroprevalence results can vary according to the study region, herd, seasonality, and type of management in cattle breeding.

The difference in the prevalence of antibodies against anti-*Trypanosoma* spp. in different regions in RS support defining areas for trypanosomosis transmission risk. The

western intermediate regions of Uruguaiiana and Ijuí had the highest serological prevalence, with over 30% detection frequency.

Several circumstances contribute to trypanosome dissemination over a region. The western RS is characterized by a high cattle population with properties that have animal trafficking characteristics. The national and international trade of live livestock represents a serious risk factor; moreover, the introduction of infected animals with subclinical or chronic trypanosomosis is the main risk factor for *T. vivax* dissemination from endemic to non-endemic regions. Further studies on naturally infected herds have demonstrated that *T. vivax* induces chronic asymptomatic infection in cattle from endemic areas (Ventura et al., 2001; Dávila et al., 2003). Another concerning observation in animal trade is the occurrence of horses as *T. vivax* reservoirs, as observed in Paraguayan regions that border southwest Brazil and Argentina (Suganuma et al., 2022). In both animal species, obligatory *T. vivax*-mediated trypanosomosis diagnosis is not required for international or national trade.

Territorial proximity facilitates pathogen dispersion from different locations, which is an epidemiologically important factor because western RS borders Santa Catarina state and Argentina, where *T. vivax* was detected in cattle (Paoletta et al., 2018; Da Silva et al., 2022). Some serological studies using symptomatic cattle from the western region of Santa Catarina detected 39.0% (57/146) seropositive animals, suggesting *T. vivax* existence in these areas. In the Argentine territory, *T. vivax* outbreaks have been described in cattle from Formosa and Mesopotamia Argentina. The agro-ecological conditions of these neighboring regions are similar to those of western RS, with potential risk of dispersion among the Pampa biome regions that border Brazil (Abdala et al., 2020; Monzon et al., 2013; Paoletta et al., 2018). Moreover, the main intermediate regions (Ijuí, Uruguaiiana, and Passo Fundo) where anti-*Trypanosoma* spp. antibodies were detected in this study, border these locations in Santa Catarina and Argentina. Thus, it is important to suggest the intermediate regions of Ijuí, Uruguaiiana, and Passo Fundo as risk areas for trypanosomosis in cattle from RS.

Immunological cross-reactivity between trypanosome species may occur, mainly between *T. vivax* and *T. evansi*, which share many common antigens (Uzcanga et al., 2004). Their coexistence in southern Brazil makes precise interpretation of serological tests difficult, necessitating the use of molecular tools to determine the species involved. Furthermore, the new species discovered in Argentina may also be present in Brazilian herds and must be considered without knowing its influence on immunological tests. Therefore, antibodies should

be associated with specific species with caution; the antibodies found in this study are not considered *T. vivax*-specific.

Despite the high detection rate in cattle from the same herd, anti-*Trypanosoma* spp. IgG antibodies were observed in many dairy herds from Passo Fundo, Porto Alegre, and Pelotas. Rainy periods and/or high humidity contribute to developing mechanical vectors in the environment, as well as improving the possibility of increasing the infection rate of cattle from the same herd. This phenomenon was also observed by Cuglovici et al. (2010), where seroprevalence ratios in dairy cattle herds from Igarapé and Minas Gerais were 7.4–48.0%, with the highest incidence was correlated with an increased *S. calcitrans* population during rainy seasons. Thereby, *S. calcitrans* can corroborate trypanosomosis epidemiology in RS, as it is a widely distributed ectoparasite in RS.

In summary, detecting antibodies against *Trypanosoma* spp. in cattle from RS provides evidence that these herds have been exposed to these pathogens. Further studies on trypanosomosis epidemiology should attempt to conclusively link the pathogens to animal production losses. Owing to the possibility of cross-reactions with other trypanosomes in serological methods, combined parasitological and molecular methods would provide a clear understanding of the specific species infecting the seropositive animals and the epizootiological situation of the trypanosomes present in cattle herds from RS.

Conclusion

This is the first serological study of trypanosomosis in cattle from RS. This study detected antibodies against *Trypanosoma* spp. in cattle from almost all intermediate regions, thus suggesting a possible risk of trypanosomosis outbreaks, mainly in animals from the western RS. The intermediate regions from Ijuí, Uruguaiana, and Passo Fundo were suggested as risk areas for bovine trypanosomosis due to high seroprevalence. These findings highlight the need for an effective surveillance program to diagnose and prevent trypanosomosis spread, thus reducing disease impact on livestock productivity, which may otherwise be overlooked and underdiagnosed in RS.

Funding

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - Financial code 001 and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for the financial support

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Availability of data and material

Not applicable

References

Abdala AA, Larriestra AJ, Signorini M. Estimación de pérdidas económicas causadas por *Trypanosoma vivax* en un rodeo lechero de Argentina. *Rev Vet* 2020; 31: 115-119.

<http://dx.doi.org/10.30972/vet.3124728>

Batista JS, Riet-correa F, Teixeira MMG, Madruga CR, Simões SDV, Maia TF. Trypanosomiasis by *Trypanosoma vivax* in cattle in the Brazilian semiarid: Description of an outbreak and lesions in the nervous system. *Vet Parasitol* 2007; 143: 174-181.

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.08.017>

Büscher P. Diagnosis of African trypanosomiasis. In: Magez S, Radwanska M. *Trypanosomes and Trypanosomiasis*. Springer: Wien; 2014. p. 189-216.

Cadioli FA, Barnabé PA, Machado RZ, Teixeira MCA, André MR, Sampaio PH, Fidélis Junior OL, Teixeira MMG, Marques LC. First report of *Trypanosoma vivax* outbreak in dairy cattle in São Paulo state, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 2012; 21(2): 118-124.

<https://doi.org/10.1590/S1984-29612012000200009>

Camargo ME. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of American tripanosomiasis: technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. *Rev Inst Med Trop* 1996; São Paulo 8: 227-34.

Carvalho AHO, Júnior FAS, Daher DO, Rocha CMBM, Guimarães AM. Efeito do sistema de produção de leite sobre a estabilidade enzoótica para *Anaplasma marginale* e *Babesia bovis* em bezerras na região do Campo das Vertentes de Minas Gerais, Brasil. *Semina: Ciênc Agrár* 2012; 33: 323-332. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2012v33n1p323>

Cuglovici DA, Bartholomeu DC, Reis-cunha JL, Carvalho AU, Ribeiro MFB. Epidemiologic aspects of an outbreak of *Trypanosoma vivax* in a dairy cattle herd in Minas Gerais state, Brazil. *Vet Parasitol* 2010; 169: 320-326. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.12.041>

Da Silva AS, Perez HAG, Costa MM, França RT, Gasperi D, Zanette RA, Amado JA, Lopes STA, Teixeira MMG, Monteiro SG. Horses naturally infected by *Trypanosoma vivax* in southern Brazil. *Parasitol Res* 2011; 108:23–30. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-2036-2>

Da Silva AS, Molosse VL, Deolindo GL, Cecere BG, Vitt MG, Nascimento LFN, Neves GB, Sartor J, Sartori VH, Baldissera MD, Miletti LC. *Trypanosoma vivax* infection in dairy cattle: Parasitological and serological diagnosis and its relationship with the percentage of red blood cells. *Microb Pathog* 2022; 166: 105495. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2022.105495>

Dávila AMR, Herrera HM, Schlebinger T, Souza SS, Cseko YMT. Using PCR for unraveling the cryptic epizootiology of livestock trypanosomosis in the Pantanal. *Braz Vet Parasitol* 2003; 117: 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2003.08.002>

De Mello VVC, Ramos IAS, Herrera HM, Mendes NS, Calchi AC, Campos JBV, et al. Occurrence and genetic diversity of hemoplasmas in beef cattle from the Brazilian Pantanal, an endemic area for bovine trypanosomiasis in South America. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2019; 66: 101337. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2019.101337>

Garcia HA, Ramírez OJ, Rodrigues CMF, Sánchez RG, Bethencourt AM, Pérez GDM, Minervino AHH, Rodrigues AC, Teixeira MMG. *Trypanosoma vivax* in water buffalo of the Venezuelan llanos: an unusual outbreak of wasting disease in an endemic area of typically asymptomatic infections. *Vet Parasitol* 2016; 230: 49–55. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.10.013>

Gardiner PR, Mahmoud MM. Salivarian trypanosomes causing disease in livestock outside sub-saharan Africa. In: Kreier JP, Baker JR. *Parasitic Protozoa*. 2 ed. Academic Press: London; 1992. p. 277–313.

Gonzatti MI, González-Baradat B, Aso PM, Reyna-Bello A. *Trypanosoma (Duttonella) vivax* and Typanosomosis in Latin America: secadera/huequera/cacho hueco. In: Magez S, Radwanska M. *Trypanosomes and Trypanosomiasis*. Springer: Wien; 2014. p. 261–285.

Guedes-Junior DS, Araújo FR, Silva FJ, Rangel CP, Neto JDB, Fonseca AH. Frequency of antibodies to *Babesia bigemina*, *B. bovis*, *Anaplasma marginale*, *Trypanosoma vivax* and *Borrelia burgdorferi* in cattle from the northeastern region of the state of Pará, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 2008; 17: 105-109. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612008000200008>

Guerra NR, Monteiro MFM, Sandes HMM, Cruz NLN, Ramos CAN, Santana VLA, Souza MMA, Alves LC. Detecção de anticorpos IgG anti-*Trypanosoma vivax* em bovinos através do teste de imunofluorescência indireta. *Pesq Vet Bras* 2013; 33: 1423-1426. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2013001200005>

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2017. IBGE. Rio de Janeiro: IBGE, Triênio 2018-2020. Available in: <https://www.ibge.gov.br/pt/inicio.html>. Access in: 16 set. 2022.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2022. IBGE. Regiões Geográficas do Brasil. Available in: https://www.ibge.gov.br/apps/regioes_geograficas/#/home/. Access in: 3 marc. 2022.

Jones TW, Dávila AMR. *Trypanosoma vivax* – out of Africa. *Trends Parasitol* 2001; 17: 99-101. [https://doi.org/10.1016/s1471-4922\(00\)01777-3](https://doi.org/10.1016/s1471-4922(00)01777-3)

Linhares GFC, Filho FCD, Fernandes PR, Duarte SC. Tripanossomíase em bovinos no município de Formoso do Araguaia, Tocantins: relato de caso. *Cienc Anim Bras* 2006; 7: 455-460.

Lopes STP, Prado BS, Martins GHC, Beserra HEA, Sousa Filho MAC, Evangelista LSM, et al. *Trypanosoma vivax* em bovino leiteiro. *Acta Sci Vet* 2018; 46: 287.

Monzon CM, Mancebo OA, Giménez JN, Russo AM. Evolución de la Trypanosomosis bovina por *Trypanosoma vivax* en Formosa (Argentina). Años 2007-2012 y su potencial dispersión en el país. *Rev Ibero Latin Parasitol* 2013; 72 (1): 38-44.

Osório ALAR, Madruga CR, Desquesnes M, Soares CO, Ribeiro LRR, Da Costa CG. *Trypanosoma (Duttonella) vivax*: its biology, epidemiology, pathogenesis, and introduction in the New World: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008; 103:1-13. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762008000100001>

Otte MJ, Abuabara JY. Transmission of South-American *Trypanosoma vivax* by the neotropical horsefly *Tabanus nebulosus*. *Acta Trop* 1991; 49: 73–76. [https://doi.org/10.1016/0001-706X\(91\)90033-G](https://doi.org/10.1016/0001-706X(91)90033-G)

Otte MJ, Abuabara JY, Wells EA. *Trypanosoma vivax* in Colombia: epidemiology and production losses. *Trop Anim Health Prod* 1994; 26: 146-156. <https://doi.org/10.1007/bf02241071>

Paoletta MS, Arias LL, De La Fourniere S, Guillemi EC, Luciani C, Sarmiento NF, Mosqueda J, Farber MD, Wilkowsky SE. Epidemiology of *Babesia*, *Anaplasma* and *Trypanosoma* species using a new expanded reverse line blot hybridization assay. *Ticks Tick-Borne Dis* 2018; 9:155-163. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.08.011>

Radostitis OM, Gay CC, Hinchcliff KW, Constable PD. *Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle, sheep, goats, pigs and horses*, 10th ed. Saunders: Elsevier; 2006.

Seidl A, Dávila AMR, Silva RAMS. Estimated financial impact of *Trypanosoma vivax* on the Brazilian Pantanal and Bolivian Lowlands. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999; 94: 269-272. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761999000200027>

Serra-Freire NM. Oiapoque-outra foco de *Trypanosoma vivax* no Brasil. *Rev Bras Med Vet* 1981; 4: 30–31.

Shaw JJ, Lainson R. *Trypanosoma vivax* in Brazil. *Ann Trop Med Parasitol* 1972; 66: 25–32.
<https://doi.org/10.1080/00034983.1972.11686794>

Silva AS, Costa MM, Polenz MF, Polenz CH, Teixeira MMG, Lopes STA, Monteiro SG. Primeiro registro de *Trypanosoma vivax* em bovinos no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Cienc Rural* 2009; 39: 2550-2554.

Silva RAMS, Silva JA, Schneider RC, Freitas J, Mesquita D, Mesquita T, Ramirez L, Dávila AMR, Pereira MEB. Outbreak of trypanosomiasis due to *Trypanosoma vivax* (Ziemann, 1905) in bovine of the Pantanal, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1996; 52: 561-562.
<https://doi.org/10.1590/s0074-02761996000500005>

Stevens J, Brisse S. Systematics of trypanosomes of medical and veterinary importance. In: Maudlin I, Holmes P., Miles M. *The trypanosomiases*. CABI Publishing. 2004; p. 1–19.

Suganuma K, Kayano M, Kida K, Gröhn YT, Miura R, Ohari Y, Mizushima D, Inoue N. Genetic and seasonal variations of *Trypanosoma theileri* and the association of *Trypanosoma theileri* infection with dairy cattle productivity in Northern Japan. *Parasitol Int* 2022; 86: 102476. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2021.102476>

Uzcanga GL, Perrone T, Noda JÁ, Péres-Pazos J, Medina R, Hoebeke J, Bubis J. Variant Surface Glycoprotein from *Trypanosoma evansi* is partially responsible for the Cross-Reaction between *Trypanosoma evansi* and *Trypanosoma vivax*. *Biochem* 2004; 43: 595-606.
<https://doi.org/10.1021/bi0301946>

Ventura RM, Paiva F, Silva RA, Takeda GF, Buck GA, Teixeira MM. *Trypanosoma vivax*: characterization of the spliced leader gene of a Brazilian stock and species-specific detection by PCR amplification of an intergenic spacer sequence. *Exp Parasitol* 2001; 99: 37–48.
<https://doi.org/10.1006/expr.2001.4641>

Wells EA, Betancourt A, Ramirez LE. *Trypanosoma vivax* in Colombia – epidemiology and economic impact. *World Anim Rev* 1982; 17–23.

Table headings**Table 1.**

The serological detection of *Trypanosoma* spp. in cattle serum samples collected from the Rio Grande do Sul intermediate regions.

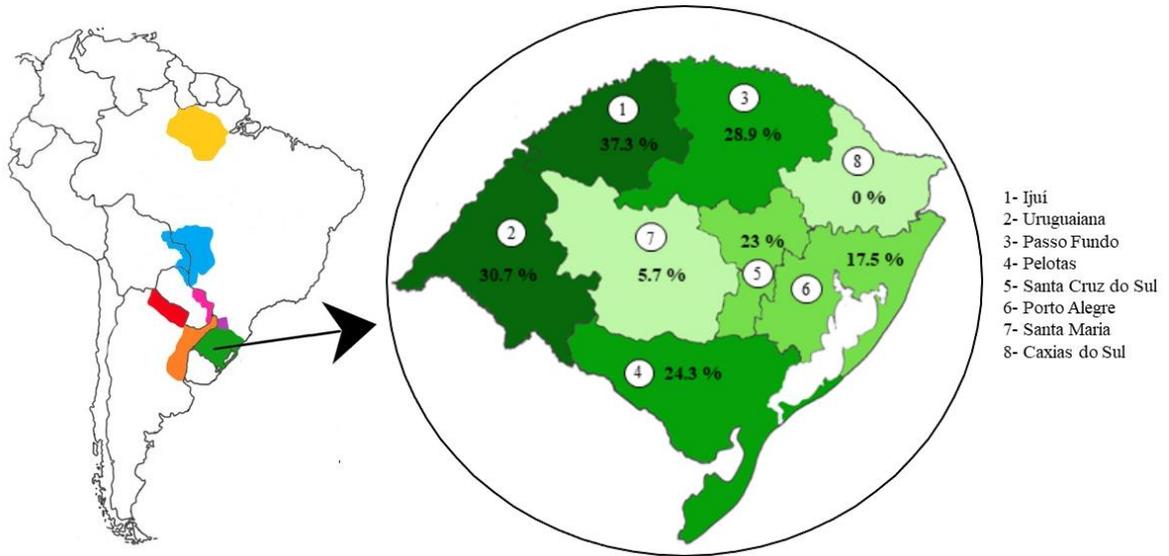
Figure captions**Figure 1.**

Map of Rio Grande do Sul (right) showing *Trypanosoma* spp. seroprevalence in cattle according to the intermediate regions. (Left) Map showing *T. vivax* occurrence in South America: upper Rio Paraguay basin, including portions of the Brazilian, Bolivian, and Paraguayan Pantanal regions (blue); Alto Paraná, Amambay, Canindeyú, and Concepción regions of Paraguay (pink); western Santa Catarina (purple); Formosa region of Argentina (red); Mesopotamia Argentina (orange); and Rio Grande do Sul (green).

Table 1:

Intermediate Region	Absolute frequency of positive animals	Relative frequency of positive animals	Number of positive animals per herd	Cattle breeding
Caxias do Sul	0/ 19	0%	0/19 (0%)	Not informed
Ijuí	31/ 83	37.34%	0/7 (0%)	Not informed
			0/7 (0%)	Not informed
			31/69 (44.92%)	Dairy Cattle
Passo Fundo	40/ 138	28.98%	4/39 (10.25%)	Dairy Cattle
			9/40 (22.5%)	Dairy Cattle
			4/13 (30.76%)	Dairy Cattle
			10/22 (45.45%)	Dairy Cattle
			6/13 (46.15%)	Dairy Cattle
			7/11 (63.63%)	Dairy Cattle
Pelotas	26/ 107	24.29%	1/24 (4.16%)	Not informed
			3/27 (11.11%)	Not informed
			22/56 (39.28%)	Not informed
Porto Alegre	14/ 80	17.5%	5/57 (8.77%)	Not informed
			9/23 (39.13%)	Not informed
Santa Cruz do Sul	15/65	23,07%	2/18 (11.11%)	Dairy Cattle
			2/8 (25%)	Not informed
			5/19 (26.31%)	Not informed
Santa Maria	4/ 69	5.79%	4/69 (5.79%)	Dairy Cattle
Uruguaiiana	46/ 150	30.66%	1/9 (11.11%)	Beef Cattle
			3/19 (15.78%)	Beef Cattle
			3/12 (25%)	Beef Cattle
			36/102 (35.29%)	Beef Cattle
			3/8 (37.5%)	Beef Cattle
Total	170/691	24.6%	24 herds	

Figure 1.



4 CONCLUSÃO

A detecção de anticorpos anti-*Trypanosoma* spp. em amostras bovinos do Rio Grande do Sul, através da técnica de RIFI, é uma evidência que demonstra a circulação de *Trypanosoma* no estado. Esse é o primeiro estudo sorológico de tripanossomose bovina realizado no estado, e a presença de animais reagentes em quase todas as regiões intermediárias de estudo indica que o protozoário está disseminado entre os rebanhos. De acordo com os resultados, as regiões intermediárias de Ijuí, Uruguaiana e Passo Fundo foram as que obtiveram maior frequência de detecção de animais com anticorpos anti-*Trypanosoma* spp., e por este motivo, foram sugeridas como áreas de risco para a transmissão da tripanossomose bovina. Esses resultados devem servir de alerta para as autoridades veterinárias, visando a necessidade da implementação de um programa efetivo de vigilância da doença, para investigar, diagnosticar e prevenir a disseminação da tripanossomose bovina, uma vez que o impacto da doença pode estar sendo negligenciado e subdiagnosticado no Rio Grande do Sul.

5 REFERÊNCIAS

AMATO, B. *et al.* A case of bovine trypanosomiasis caused by *Trypanosoma theileri* in Sicily, Italy. **Parasitology Research**, v. 118, n. 9, p. 2723–2727, 13 jul. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06390-y>.

AUTHIÉ, E.; MUTETI, D.K.; WILLIAMS, D.J.L. Antibody responses to non-variant antigens of *Trypanosoma congolense* in cattle of differing susceptibility to trypanosomiasis. **Parasite Immunology**, v. 15, p. 101–111, 20 jul. 1993.

BASTOS, T. S. A. *et al.* First outbreak and subsequent cases of *Trypanosoma vivax* in the state of Goiás, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, Jaboticabal, v. 26, n. 3, p. 366-371, jul. 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612017019>.

BATISTA, J. S.; BEZERRA, F. S. B.; LIRA, R. A. *et al.* Aspectos clínicos, epidemiológicos e patológicos da infecção natural em bovinos por *Trypanosoma vivax* na Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 28, n. 1, p. 63-69, jan. 2008.

BOSSARD, G. *et al.* Serodiagnosis of bovine trypanosomosis based on HSP70/BiP inhibition ELISA. **Veterinary Parasitology**, v. 173, n. 1-2, p. 39-47, out. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.06.016>

BOWMAN, D. G. **Parasitologia Veterinária**. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

BRAUN, U.; ROGG, E.; WALSER, M.; NEHRBASS, D. *et al.* *Trypanosoma theileri* in the cerebrospinal fluid and brain of a heifer with suppurative meningoencephalitis. **The Veterinary Record**, v. 150, p. 18–19, jan. 2002. DOI: <https://doi.org/10.1136/vr.150.1.18>.

BRENER, Z. Contribuição ao estudo da terapêutica experimental da Doença de Chagas. 1961. Tese de Livre Docência (Faculdade de Odontologia e Farmácia) Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1961.

CDC 24/7. **Epi Info™** | CDC. Disponível em: https://www.cdc.gov/epiinfo/por/pt_index.html. Acesso em: 5 dez. 2022.

CONSTABLE, P. D.; HINCHCLIFF, K. W.; DONE, S. H.; GRUNBERG, W. Systemic and multi-organ diseases: Multi-organ diseases due to trypanosome infection. In: **Veterinary Medicine: A textbook of the Diseases of Cattle, Horses, Sheep, Pigs and Goats**. Saint Louis: Missouri, 2016. p. 2150-2157.

CORTEZ, A. P.; VENTURA, R. M.; RODRIGUES, A. C. *et al.* The taxonomic and phylogenetic relationships of *Trypanosoma vivax* from South America and Africa. **Parasitology**, v. 133, p. 159-169, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0031182006000254>.

DA SILVA, A. S.; GARCIA PEREZ, H. A.; COSTA, M. M. *et al.* Horses naturally infected by *Trypanosoma vivax* in southern Brazil. **Parasitology Research**, v. 108, n. 1, p. 23–30, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00436-010-2036-2>.

DÁVILA, A. M. R.; HERRERA, H. M.; SCHLEBINGER, T. *et al.* Using PCR for unraveling the cryptic epizootiology of livestock trypanosomosis in the Pantanal. **Brazilian Veterinary Parasitology**, v. 117, p. 1-13, 2003. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2003.08.002>.

DÁVILA, A. M. R.; SILVA, R. A. M. S. Animal Trypanosomiasis in South America: Current Status, Partnership, and Information Technology. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 916, p. 199-212, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb05291.x>.

DELAFOSSÉ, A.; THÉBAUD, E.; DESQUESNES, M.; MICHAUX, Y. Epidemiology of *Trypanosoma vivax* infection in cattle in the tse-tse free area of Lake Chad. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 74, p.108–119, 2006. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2005.10.006>.

DE MELLO, V.V.C.; SOUZA RAMOS, I. A.; HERRERA, H. M. *et al.* Occurrence and genetic diversity of hemoplasmas in beef cattle from the Brazilian Pantanal, an endemic area for bovine trypanosomiasis in South America. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 66, 101337, ISSN 0147-9571, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2019.101337>.

DESQUESNES, M.; DAVILA, A.M.R. Applications of PCR-based tools for detection and identification of animal trypanosomes: a review and perspectives. **Veterinary Parasitology**, v. 109, p. 213–231, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(02\)00270-4](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(02)00270-4).

DESQUESNES, M.; HOLZMULLER, P.; DE-HUA, L. *et al.* *Trypanosoma evansi* and Surra: A Review and Perspectives on Origin, History, Distribution, Taxonomy, Morphology, Hosts, and Pathogenic Effects. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-22, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1155/2013/194176>.

DESQUESNES, M.; DARGANTES, A.; LAI, D. H. *et al.* *Trypanosoma evansi* and Surra: A Review and Perspectives on Transmission, Epidemiology and Control, Impact, and Zoonotic Aspects. **Biomed Research International**, v. 2013, p. 1-20, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/321237>.

DIRIE, M.F.; OTTE, M. J.; THATTHI, R. *et al.* Comparative studies of *Trypanosoma (Duttonella) vivax* isolates from Colombia. **Parasitology**, v. 106, n.1, p. 21-29, 1993. DOI: <http://dx.doi.org/10.1017/s0031182000074771>.

FETENE, E. *et al.* Global distribution, host range and prevalence of *Trypanosoma vivax*: a systematic review and meta-analysis. **Parasites & Vectors**, v. 14, n. 1, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04584-x>.

FIKRU, R.; GODDEERIS, B. M.; DELESPAUX, V. *et al.* Widespread occurrence of *Trypanosoma vivax* in bovines of tsetse- as well as non-tsetse-infested regions of Ethiopia: a reason for concern?. **Veterinary Parasitology**, v. 190, n. 3-4, p. 355–361, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.07.010>.

GARCIA, H. A.; RAMÍREZ, O. J.; RODRIGUES, C. M. F. *et al.* *Trypanosoma vivax* in water buffalo of the Venezuelan Llanos: An unusual outbreak of wasting disease in an endemic area of typically asymptomatic infections. **Veterinary Parasitology**, v. 230, p. 49-55, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.10.013>.

GARDINER, P. R.; MAHMOUD, M. M. Salivarian trypanosomes causing disease in livestock outside sub-saharan Africa. *In*: KREIER, J. P; BAKER, J. R. **Parasitic Protozoa**. London, 1992. p. 277–313.

GONZATTI, M. I.; GONZÁLEZ-BARADAT, B. *et al.* *Trypanosoma (Duttonella) vivax* and Trypanosomosis in Latin America: Secadera/ Huequera/ Cacho Hueco. In: MAGEZ, S.; RADWANSKA, M. **Trypanosomes and Trypanosomiasis**. Verlag Wien, 2014.

GUEDES-JUNIOR, D. S.; ARAÚJO, F. R.; SILVA, F. J. M.; Frequency of antibodies to *Babesia bigemina*, *B. bovis*, *Anaplasma marginale*, *Trypanosoma vivax* and *Borrelia burgdorferi* in cattle from the northeastern region of the state of Pará, Brazil. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 2, p. 105-109, 2008.

DOI: <https://doi.org/10.1590/S1984-29612008000200008>.

HERRERA, H. M. *et al.* Enzootiology of *Trypanosoma evansi* in Pantanal. **Brazilian Veterinary Parasitology**, v. 125, n. 3-4, p. 263–275, nov. 2004.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.07.013>.

JONES, T. W.; DÁVILA, A. M. R *Trypanosoma vivax* – out of Africa. **Trends in Parasitology**, v. 17, n. 2, p. 99-101, 2001.

DOI: [https://doi.org/10.1016/s1471-4922\(00\)01777-3](https://doi.org/10.1016/s1471-4922(00)01777-3).

KATENDE, J. M.; MUSOKE, A. J.; NANTULYA, V. M.; GODDEERIS, B.M. A new method for fixation and preservation of trypanosomal antigens for use in the indirect immunofluorescence antibody test for diagnosis of bovine trypanosomiasis. **Annals of Tropical Medicine Parasitology**, v. 38, n. 1, p. 41-49, PMID: 3299658, 1987.

MADRUGA, C. R.; ARAÚJO F. R.; CAVALCANTE-GOES, G. *et al.* The development of na enzyme-linked immunosorbent assay for *Trypanosoma vivax* antibodies and its use in epidemiological surveys. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, n. 7, p. 801-807, 2006.

OIE, 2018. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, 8 ed. OIE, Paris.

OSÓRIO, A.; MADRUGA, C. R.; DESQUESNES, M. *et al.* *Trypanosoma (Duttonella) vivax*: its biology, epidemiology, pathogenesis, and introduction in the New World - a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 1, p. 1-13, 2008.

DOI: <https://doi.org/10.1590/S0074-02762008000100001>.

PEREIRA, H. D. *et al.* Aspectos clínicos, epidemiológicos e diagnóstico da infecção por *Trypanosoma vivax* em rebanho bovino no estado do Maranhão. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 5, p. 896-901, mai. 2018.

DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-5303>.

PÉREZ, H. A. G. *et al.* High *Trypanosoma vivax* infection rates in water buffalo and cattle in the Brazilian Lower Amazon; **Parasitology International**, v. 79, 102162, 2020.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.parint.2020.102162>.

PIMENTEL, D. S. *et al.* First report and molecular characterization of *Trypanosoma vivax* in cattle from state of Pernambuco, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 185, n. 2-4, p. 286–289, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.10.019>.

- PLATT, K. B.; ADAMS, L. G. Evaluation of the indirect fluorescent antibody test for detecting *Trypanosoma vivax* in South American cattle. **Research in Veterinary Science**. v. 21, n. 1, p. 53-8, ID 781765, 1976.
- RADOSTITIS, O. M. *Veterinary Medicine – A textbook of the diseases of cattle, sheep, goats, pigs and horses*. 10. ed. Elsevier, 2006.
- SHAW, J. J.; LAINSON, R. *Trypanosoma vivax* in Brazil. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 66, p. 25-32, 1972.
- SILVA, R. A. M. S.; SANCHEZ, V.; DÁVILA, A. M. R. Métodos de diagnósticos parasitológicos das tripanosomoses bovinas e equinas. **Embrapa Pantanal: Circular Técnica Corumbá**, v. 41, 2003. Disponível em: < <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/811014/metodos-de-diagnosticos-parasitologicos-das-tripanosomoses-bovinas-e-equinas>>. Acesso em: 17 out. 2022.
- SILVA, A. S.; COSTA, M. M.; POLENZ, M. F. *et al.* Primeiro registro de *Trypanosoma vivax* em bovinos no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 39, p. 2550-2554, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-84782009005000189>.
- SOOD, N.; SINGLA, L.; SINGH, R.; UPPAL, S. Association of *Trypanosoma theileri* with peritonitis in a pregnant cross-bred cow: a case report. **Veterinary Medicine**, v. 56, n. 2, p. 82-84, 2011. DOI: <https://doi.org/10.17221/1580-VETMED>.
- SUGANUMA, K.; KAYANO, M.; KIDA, K. *et al.* Genetic and seasonal variations of *Trypanosoma theileri* and the association of *Trypanosoma theileri* infection with dairy cattle productivity in Northern Japan. **Parasitology International**, v. 86, ID 102476, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.parint.2021.102476>.
- TAYLOR, M. A.; COOP, R. L.; WALL, R. L. **Parasitologia Veterinária**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.
- TIZARD, I. R. **Imunologia Veterinária**. 9. ed. São Paulo: Roca, 2014.
- VIERA, O. L. E.; MACEDO, L. O.; SANTOS, M. A. B. *et al.* Detection and molecular characterization of *Trypanosoma (Duttonella) vivax* in dairy cattle in the state of Sergipe, northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 26, n. 4, p. 516-520, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1984-29612017048>.
- VENTURA, R. M.; PAIVA, F.; SILVA, R. A., *et al.* *Trypanosoma vivax*: characterization of the spliced leader gene of a Brazilian stock and species-specific detection by PCR amplification of an intergenic spacer sequence. **Experimental Parasitology**, v. 99, p. 37-48, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1006/expr.2001.4641>.
- WOO, P.T.K. The haematocrit centrifuge technique for the diagnosis of African trypanosomiasis. **Acta Tropica**, v. 27, p. 384-386, 1970.